

タバコ・モザイク・ウイルスに感染した*Nicotiana glutinosa*葉 の局部病斑形成時期における蛋白質および核酸代謝

| | |
|-------|--|
| 誌名 | 日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan |
| ISSN | 00319473 |
| 著者 | 後藤, 孝男 谷口, 武 |
| 巻/号 | 44巻2号 |
| 掲載ページ | p. 120-126 |
| 発行年月 | 1978年4月 |

タバコ・モザイク・ウイルスに感染した *Nicotiana glutinosa* 葉の局部病斑形成時期における蛋白質および核酸代謝

後藤 孝男*・谷口 武*

Takao GOTO* and Takeshi TANIGUCHI* : Protein and Nucleic Acid Metabolisms in Leaves of *Nicotiana glutinosa* Systemically Infected with Tobacco Mosaic Virus and Induced to Form Local Lesions

Abstract

Protein and nucleic acid metabolisms in tobacco mosaic virus-infected *Nicotiana glutinosa* leaves were investigated. The plants were incubated at 32 C for 2 or 3 days after inoculation with tobacco mosaic virus to establish a systemic infection and then some of these infected plants were transferred to 25 C to induce local lesions and the others were kept 32 C as controls. The leaves of each plant were detached and labeled by $^{14}\text{CO}_2$. The supernatant fraction (S), mainly soluble proteins, obtained from the sap of the leaves by ultracentrifugation ($105,000 \times g$) and the SDS-solubilized fraction (PS), mainly particulate-bound proteins, of precipitates at $10,000 \times g$, were electrophoresed on polyacrylamide gel columns. No difference in the proportion of protein was detected in both S and PS fractions between control and shifted plants. The incorporation of ^{14}C from $^{14}\text{CO}_2$ into the pellet fraction (P) at $105,000 \times g$, virus fraction, was reduced by the temperature shift. Methylated albumin kieselgur column chromatography of nucleic acid fractions obtained by phenol-SDS method showed that no significant change occurred in the proportion of molecular species of nucleic acids after temperature shift.

(Received November 28, 1977)

緒 言

局部病斑宿主でのウイルス感染初期における代謝変化の研究は、従来フェノール代謝にその重きがおかれてきた。フェノール代謝の変化は局部病斑形成に伴って生ずるものと考えられているが^{5,17)}、接種してから局部病斑形成までのごく初期の代謝変化についてはまだ明らかでない。カロースは局部病斑形成に先立って局部病斑の外縁部すなわち健病両部分の境界付近に集積する^{4,18,25-27)}。この物質はウイルス移行の物理的障害物質とみられているが、局部病斑形成におけるその役割については明確にされていない。また最近全身感染系においても種々の処理をすることにより、局部感染系において生ずる様な病斑を形成することが

報告されている^{11-14,19,23)}。しかし局部病斑形成の機構についてはほとんど検討されていない。

タバコ・モザイク・ウイルス (TMV) を接種した局部病斑宿主を温度処理すると、その後それぞれの系統に固有の時間に病斑が出現する。著者らは先にこの温度処理と TMV の二系統を用いた比較実験から局部病斑形成の過程は二相より成ることを明らかにした⁷⁾。第一相ではウイルスの増殖が主であり、第二相では組織崩壊が起り目に見える局部病斑が形成される。そこで本実験では TMV 接種グルチノーザ葉の第二相における蛋白質ならびに核酸代謝の変化について検討した。

なお本稿の作製に当り当研究室教授富山宏平博士に有益な助言を頂いた。深く感謝の意を表する。

* 名古屋大学農学部 Plant Pathology Laboratory, Faculty of Agriculture, Nagoya University, Nagoya, Japan.

実験材料および方法

植物とウイルス 植物は *Nicotiana glutinosa* を用い、ウイルスはタバコ・モザイク・ウイルスの普通系統 (TMV-OM) を用いた。TMV-OM は当研究室において *Nicotiana tabacum* 'Bright Yellow' で継代保存されたものである。

ウイルスの純化法 ウイルスの純化は前報に述べた方法に準じて行った⁶⁾。純化したウイルスは10-100 $\mu\text{g/ml}$ に調製しこれを接種源とした。

ウイルス接種、培養および局部病斑誘導法 グルチノーザ葉に600メッシュのカーボランダムをふりかけてウイルス液を含ませた綿球で摩擦して接種した。

TMV-OM を接種したグルチノーザは2-3日間高温 (32-33C) に置いた。この条件ではグルチノーザはTMV-OM に全身感染し局部病斑を生じない。次にこれを常温 (24-25C) に移すか (温度処理)、接種葉を切り取って高温条件下でアクチノマイシンD (AMD) 処理をした。この時いずれの処理においても局部病斑を生ずる^{8,13)}。高温に置いたグルチノーザではこれらの処理前に局部病斑形成に必要な量のウイル

スが増殖している。なおAMDは葉柄より200 $\mu\text{g/ml}$ 液を葉当り0.5mlあてて吸収させた。

$^{14}\text{CO}_2$ によるグルチノーザ葉のラベル法 $^{14}\text{CO}_2$ でのラベルはDokeとHirai⁹⁾の報告を参考とし次の様に行った。即ち、鉢植グルチノーザをTMV接種後2-3日高温 (32-33C) に保ち、さらに局部病斑誘導処理後4時間経た葉を切り取って密閉できる光合成用容器 (およそ縦25cm×横35cm×高さ5cm) 中に置いた。葉の下には $^{12}\text{CO}_2$ を十分溶かした蒸留水で湿した濾紙を敷いた。次にこの容器を減圧状態とした後、 $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ に1N塩酸を添加して発生させた $^{14}\text{CO}_2$ を導入した。容器内での CO_2 量は0.03-0.05%になる様に $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ 量によって調整し、光 (およそ4000ルクス) をあてて30分間光合成を行わせた。その後は直ちに凍結または2時間 $^{12}\text{CO}_2$ の存在下で光合成を行なわせてから凍結した。

一方対照区として高温に置いたままのものおよびTMVを接種しなかったものを同様に処理した。

摩砕および蛋白質分画法 $^{14}\text{CO}_2$ でラベルした後フリーザー (-20C) 中で凍結したグルチノーザは0.1M磷酸緩衝液 (PB) (pH7.2) を1葉当り1ml加

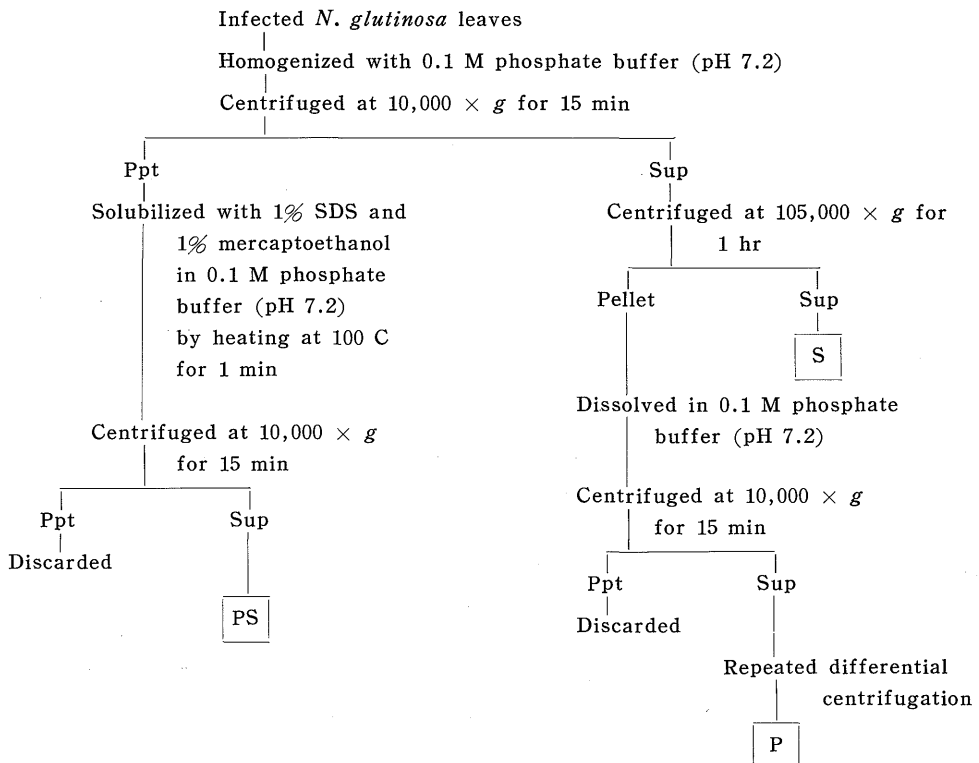


Fig. 1. Fractionation of infected *N. glutinosa* leaves into S (mainly soluble proteins), PS (mainly particulate-bound proteins) and P (mainly virus particles) fractions.

えて乳鉢で摩砕し、第1図に示した様に分画した。即ち摩砕液を10,000×g 15分間遠心し上澄部をさらに105,000×g で1時間遠心して主に緩衝液に可溶性の蛋白質を含むS分画とウイルス粒子を多量に含むペレットを得た。ペレットは再度遠心してP分画とした。最初の遠心で得た沈澱部は1%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)および1%メルカプトエタノールを含むPBに溶かし、100°Cで1分間可溶化処理¹⁰⁾した後遠心し、主に顆粒等に結合していた蛋白質を含むPS分画を得た。

核酸分画の抽出法 ¹⁴Cでラベルしたグルチノーザ葉をドライアイスで凍結後直ちに乳鉢ですりつぶした。約1.8gの葉に1% SDS, 25mM KCl, 25mM MgCl₂を含む25mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を15ml加え、さらに90%フェノール15mlを加えて栓付三角フラスコ内でスターラーで激しく攪拌した¹⁾。このフェノール-SDS抽出を3回くり返し、その後終濃度67%冷アルコールによる沈澱を2-3回くり返した⁶⁾。

蛋白質の電気泳動 先に分画したS, P, PSの各分画のうちSおよびP分画には最終濃度1% SDSと1%メルカプトエタノールを加え100°Cで1分間処理した¹⁰⁾。S, P, PSの各分画はそれぞれ7.5%アクリルアミド-SDSゲル中で電気泳動した。槽の緩衝液は0.1% SDSを含む0.1M PB (pH7.2)を用い8mA/管で5-6時間泳動した^{22,24)}。泳動後50%メタノールと10%酢酸混合液中で固定し、同混合液に0.25%ブリリアントブルーRを溶かした染色液に入れて染色した。

染色したゲルの吸光度は島津二波長デンストメーターにより波長560nmで測定した。一方ゲルを1または2mmのスライスとし、バイアルに少量のH₂O₂ (0.2-0.5ml)と共に入れ約60°Cに保ってゲルを溶かした。冷却後Bray's シンチレーター²⁾を10mlずつ加えてPackard Tri-Carb 液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

P分画への¹⁴C取り込みの検出法 P分画への¹⁴Cの取り込み率を計算するために、分画する前にその一部をバイアルに取り放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。同様にP分画についてもその一部を取り放射能を測定した。またそれぞれについてその容量を測定して分画前およびP分画における全取り込み量を計算し、全分画(S+PS+P, これは分画前に含まれる全取り込み量とした。)に対するP分画への取り込み率を計算した。さらにP分画にお

けるウイルス量を波長260nmの吸光度を測定することにより得、先きに得たP分画への取り込み率をウイルス量で除して単位ウイルス量当りに補正した。この様にして得たP分画への取り込み率を基に局部病斑誘導処理をしなかった試料に対する処理試料の比を求めた。

メチル化アルブミン珪藻土(MAK)カラムクロマトグラフィー MAKカラムの調製はSueoka & Cheng²¹⁾の方法によった。アルコール沈澱で集めた核酸を0.4M NaClを含む0.05M PB (pH6.7)約20mlに溶かしMAKカラムに吸着させた。0.4M-1.2M NaClの濃度勾配で溶出し4mlの分画およそ130本を得た。各分画は波長260nmにおける吸光度を測定した後1mlをバイアルに取り、トルエントリトンX-100(2:1)シンチレーター10mlを加えて放射能を測定した。

実験結果

蛋白質分画

TMV-OM接種グルチノーザ葉に0.1M PB (pH7.2)を加えて摩砕し遠心で分けたS, PSおよびP分画の電気泳動像をそれぞれ第2, 3および5図に示した。

ウイルス接種葉のS分画ではTMV蛋白質の位置に放射能のピークがみられた。しかしその他の部分の取り込みは極めて少なかった(第2図-B, C)。このことからTMV蛋白質の合成は他の宿主蛋白質に比較して速いものと考えられる。

PS分画の¹⁴Cの取り込みでは分画数35-65の間に三つのピークがあった(第3図-B, C)。このうち中央のピークはTMV蛋白質である。残る二つのピークについては不明であるが、健全葉(第3図-A)においてもまたTMV感染葉(第3図-B, C)においても存在し、ウイルス蛋白質と同様に速やかに合成される蛋白質と考えられる。またこのPS分画のTMV蛋白質はウイルス粒子以外の何らかの成分に結合していて、1% SDS, 1%メルカプトエタノール, 100°C(1分)の条件下では速やかに解離するものと考えられる。SおよびPS分画についてみると、接種葉と健全葉間の差異はTMV蛋白質のピークの有無にのみ認められ、温度処理によって局部病斑を誘導しても病斑形成時における変化は見い出されなかった。

第4図に示したP分画の吸収曲線は高度に純化されたTMVのそれに近く、この分画がかなりきれいなウイルス分画であることを示唆している。このことは分

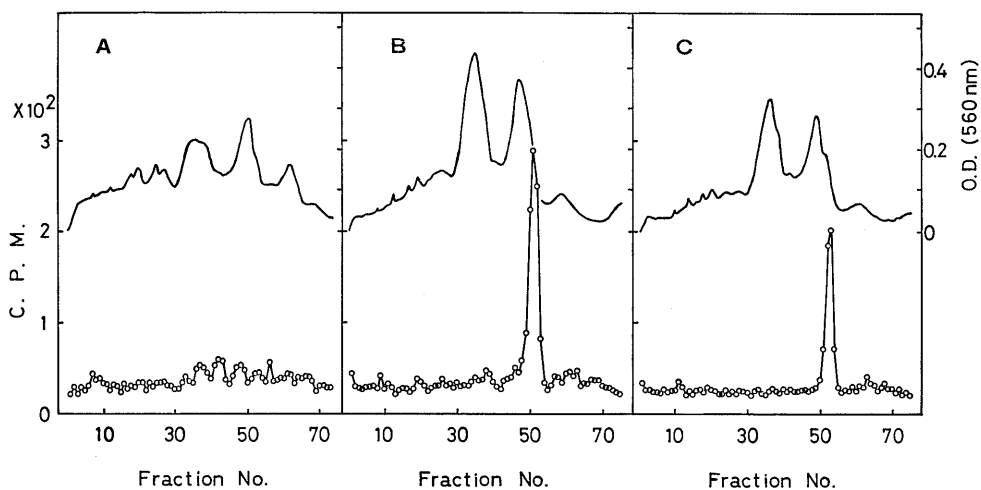


Fig. 2. The patterns of electrophoresis of S fraction obtained from $^{14}\text{CO}_2$ labeled *N. glutinosa* leaves. A : Healthy leaves incubated at 25 C. B : TMV inoculated leaves incubated at 32 C. C : TMV inoculated leaves temperature-treated (32 \rightarrow 25 C) at 2 days after inoculation.
 ○—○ : ^{14}C radioactivity (cpm), — : absorbance at 560 nm.

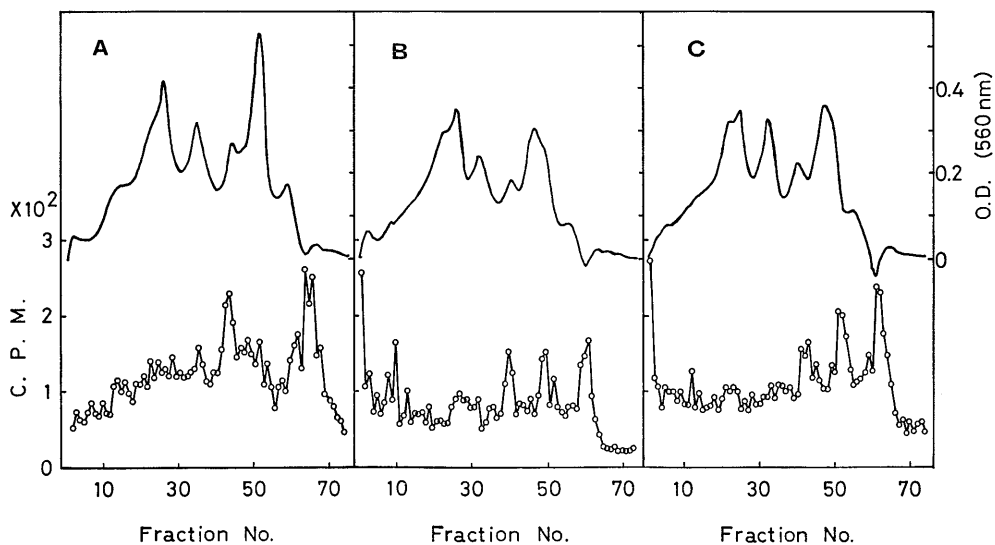


Fig. 3. The patterns of electrophoresis of PS fraction obtained from $^{14}\text{CO}_2$ labeled *N. glutinosa* leaves. A : Healthy leaves incubated at 25 C. B : TMV inoculated leaves incubated at 32 C. C : TMV inoculated leaves temperature-treated (32 \rightarrow 25 C) at 2 days after inoculation.
 ○—○ : ^{14}C radioactivity (cpm), — : absorbance at 560 nm.

画の電気泳動像(第5図-A, B, C)からも支持された。電気泳動ではこの分画で試料間の質的差異をつかむには到らなかったが、この分画全体への ^{14}C の取り込みを調べた結果、32Cから25Cに移す温度処理をした試料では ^{14}C の取り込みの低下があることが判っ

た。即ち継続して32Cに置いた対照区の試料の ^{14}C の取り込みを1.00とすると温度処理をした試料の値は平均0.810となり(第1表)、取り込みはおよそ2割程低下していた。また温度処理の代わりにAMD処理によって局部病斑を誘導すると平均値で0.896となり低下の

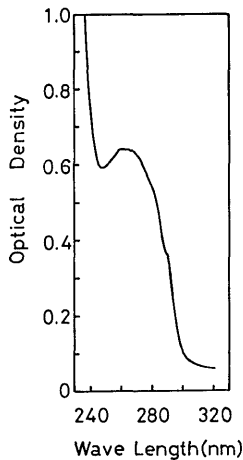


Fig. 4. UV absorption spectrum of P fraction obtained from *N. glutinosa* leaves inoculated with TMV.

傾向がみられた(第1表)。二つの異った処理によって低下が起ることから、この低下は局部病斑形成に関係しているものと考えられる。

Table 1. Effect of local lesion-inducing treatments on ^{14}C incorporation into P fraction (viral fraction) shown in Fig. 1

| Experiments | Ratio of ^{14}C incorporation ^{a)} into P fraction of treated leaves to control | |
|-------------|---|-------------------------|
| | Temperature treatment | Actinomycin D treatment |
| 1 | 0.858 | 1.015 |
| 2 | 0.697 | 0.932 |
| 3 | 0.874 | 0.742 |
| Means | 0.810 | 0.896 |

a) ^{14}C incorporation into P fraction = cpm of P fraction/cpm of total fractions/virus contents.

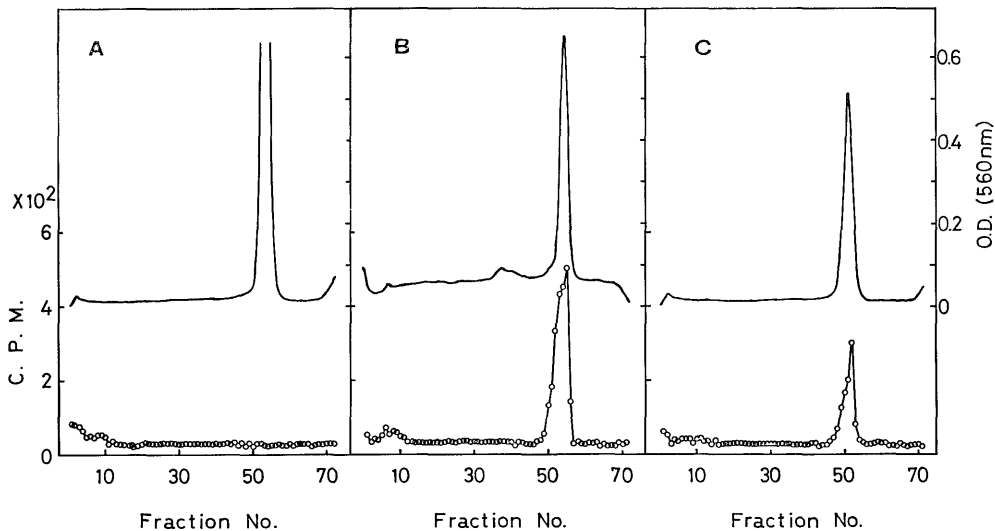


Fig. 5. The patterns of electrophoresis of P fraction obtained from $^{14}\text{CO}_2$ labeled *N. glutinosa* leaves. A: Healthy leaves incubated at 25 C. (Carrier TMV was added before homogenization.) B: TMV inoculated leaves incubated at 32 C. C: TMV inoculated leaves temperature-treated (32→25 C) at 2 days after inoculation. ○—○: ^{14}C radioactivity (cpm), —: absorbance at 560 nm.

核酸分画

フェノール- SDS 法で抽出した核酸分画を2/3容エタノール沈澱後これを集めて0.4M NaClを含む0.05M PB (pH6.7)に溶解してMAKカラムクロマトグラフィーを行った。試料を吸着させ同PBで洗った後、0.4-1.2M NaClの直線的濃度勾配で溶出したところ、s-RNA, DNA, r-RNAの各ピークを得た(第6図-A)⁹⁾。TMVを接種した試料ではr-RNA

ピークの後にTMV-RNAが肩となって溶出された(第6図-B, C)⁹⁾。フェノール- SDS法による抽出物中の大部分の ^{14}C のカウントはMAKカラムに非吸着の部分にあり、吸着した核酸部分への ^{14}C の取り込みは極めて少なかった。またDNAピークには全く取り込まれていなかった(第6図-A, B, C)。TMV-RNA部分への取り込みはTMV接種後継続して32Cに置いた葉の試料、32Cから25Cに移した葉の

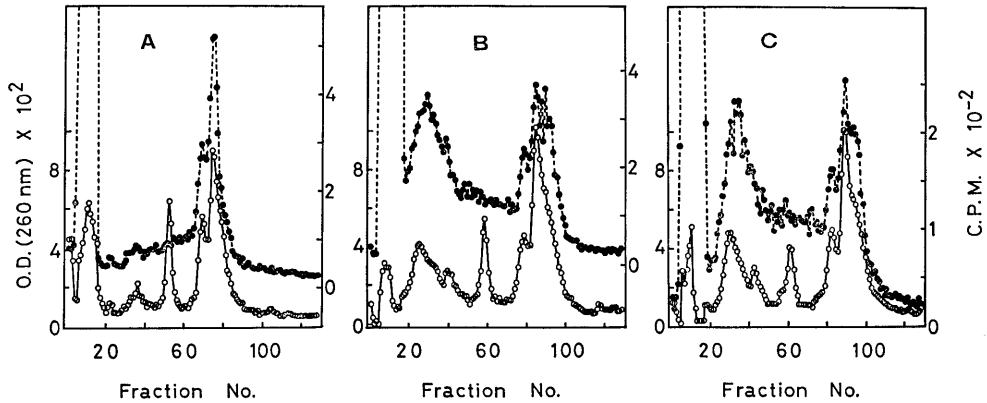


Fig. 6. Methylated albumin kieselgur column chromatogram of phenol-SDS extracts from ^{14}C labeled *N. glutinosa* leaves. A: Healthy leaves incubated at 25 C. B: TMV inoculated leaves incubated at 32 C. C: TMV inoculated leaves temperature-treated (32 \rightarrow 25 C) at 2 days after inoculation. \circ — \circ : absorbance at 260 nm, \bullet — \bullet : ^{14}C radioactivity (cpm).

試料ともに認められた。その他のピークについても各々取り込まれており、そのパターンは各試料ともほぼ同様であった。しかし量的には温度処理をした試料で核酸全体への取り込みが少い傾向にあった。

考 察

先きに著者らは局部病斑形成の過程を二相に分けることができ、その第一相ではウイルスは増殖するが局部病斑は形成されず、第二相において初めて形成されてくることを示した⁷⁾。ここでは第二相の局部病斑形成時における蛋白質および核酸の代謝変化を検討した。電気泳動法および MAK カラムクロマトグラフィーを用いた実験結果からは、第一相の状態の試料と第二相に移行した試料との間に特に有意な質的差が認められなかった。即ち局部病斑を形成し始めている条件下でも蛋白質、核酸の代謝変動はあまり大きくないと考えられる。

一方量的な検討の結果、TMV への ^{14}C の取り込みは第二相に移行したものでおよそ 1-2 割低下していることが判った。これは局部病斑形成を誘導する処理によってウイルス感染細胞のウイルス合成能が低下したか、ウイルス感染細胞の活性全体が低下したか、あるいは一部の感染細胞が死に到ったためと考えられる。大槻らによると局部病斑形成には細胞と細胞の間わりが必要である¹⁶⁾。また病斑が生じる時病斑の周辺部分から崩れ始めること¹²⁾からも示唆される様に、もし部分的に細胞死が始まったとするなら、それは感染と非感染の境界付近の細胞から始まると考えられ

る。この考えは下村および大橋²⁰⁾によりさらに明確にされた。しかしより本質的な問題はこのような現象が現れる前に起きている事象であり、また細胞間で起る「やりとり」の経緯にある。この様な点については今回の高分子分画の検討では明らかにすることができなかった。

^{14}C を用いて光合成させた時、 ^{14}C の TMV への取り込みが速やかであることが Doke と Hirai³⁾によって報告されている。我々の実験においても同様の結果を得た。TMV 蛋白質への ^{14}C の取り込みは他の蛋白質への取り込みに比べて速やかであり、Doke と Hirai も述べている様に、TMV 蛋白質合成とクロロプラストとの関係を示唆しているものと考えられる。

MAK カラムクロマトグラフィーではカラムに吸着する核酸部分には極く少量の ^{14}C しか取り込まれておらず、フェノール-SDS 抽出物中の ^{14}C のほとんどの活性が MAK に非吸着な部分にあった。核酸部分への取り込みはラベル直後から ^{12}C 存在下に置くと増加することからやや時間が必要と考えられる。また ^{14}C の取り込みが少量であることから核酸分画での正確な量的検討は困難であった。

大橋および下村¹⁵⁾は局部病斑誘導処理をすると TMV 合成に比較して 80 S リボソーム合成が強く阻害されると報告しているが、我々が MAK カラムクロマトグラフィーで得たパターンではその傾向はみられなかった。この相違は主として RI ラベルの方法ならびに時期の違いに基づくものと考えられる。筆者らの結果は少なくとも局部病斑を形成するまでの時期には核

酸および蛋白質代謝に顕著な変化はないことを示している。

摘 要

タバコ・モザイク・ウイルスに感染したグルチノーザを高温に置いた後常温に移して温度処理し、局部病斑形成過程の第二相にあたる状態の葉組織を用いてその蛋白質と核酸代謝について検討した。

105,000×gの上澄部および10,000×g沈澱のSDSによる可溶化部分の電気泳動の結果から、この分画では局部病斑形成期である第二相で大きな代謝変動はないものと考えられた。10,000×g上澄部の105,000×g沈澱部(ウイルス分画)は局部病斑形成期に¹⁴C₂からの¹⁴Cの取り込みが2割程低下し、ウイルス合成に影響が出ていることが示された。

フェノール SDS法で抽出した核酸分画をメチル化アルブミン珪藻土カラムクロマトグラフィーで検討した結果、対照区と局部病斑誘導区の間にはほとんど差がなかった。蛋白質分画および核酸分画についてみると、ウイルスの合成を除いては、この時期に余り大きな代謝変化はないものと考えられた。

引用文献

- Bourque, D. P., Hagiladi, A. and Naylor, A. W. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51 : 993-999.
- Bray, G. A. (1960). *Anal. Biochem.* 1 : 279-285.
- Doke, N. and Hirai, T. (1970). *Phytopathology* 60 : 988-991.
- Esau, K. (1967). *Ann. Rev. Phytopathol.* 5 : 45-76.
- Farkas, G. L., Kiraly, Z. and Solymosy, F. (1960). *Virology* 12 : 408-421.
- Goto, T. and Taniguchi, T. (1971). *Japan. J. Microbiol.* 15 : 443-448.
- Goto, T. and Taniguchi, T. (1976). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 42 : 549-555.
- Kassanis, B. (1952). *Ann. appl. Biol.* 39 : 358-369.
- Kubo, S., Tomaru, T., Nitta, T., Shiroya, T. and Hidaka, Z. (1965). *Virology* 26 : 406-412.
- Maizel, J. V., White Jr., D. O. and Scharff, M. D. (1968). *Ibid.* 36 : 115-125.
- 大橋祐子・下村徹 (1971). *日植病報* 37 : 22-28.
- 大橋祐子・下村徹 (1971). *同上* 37 : 211-214.
- Ohashi, Y. and Shimomura, T. (1972). *Virology* 48 : 601-603.
- 大橋祐子・下村徹 (1973). *日植病報* 39 : 81-83.
- 大橋祐子・下村徹 (1975). *同上* 41 : 294-295.
- Otsuki, Y., Shimomura, T. and Takebe, I. (1972). *Virology* 50 : 45-50.
- Parish, C. L., Zaitlin, M. and Siegel, A. (1965). *Ibid.* 26 : 413-418.
- 下村徹 (1972). *日植病報* 38 : 75-80.
- Shimomura, T. and Ohashi, Y. (1971). *Virology* 43 : 531-532.
- 下村徹・大橋祐子 (1977). *日植病報* 43 : 224-227.
- Sueoka, N. and Cheng, T. Y. (1962). *J. Mol. Biol.* 4 : 161-172.
- Summers, D. F., Maizel, J. V. and Darnell Jr., J. F. (1965). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 54 : 505-513.
- Takagi, Y. and Sugimura, Y. (1973). *Can. J. Bot.* 51 : 825-826.
- Tezuka, N. and Taniguchi, T. (1972). *Virology* 48 : 297-299.
- Wu, J. H. (1973). *Ibid.* 51 : 474-478.
- Wu, J. H. and Dimitman, J. E. (1969). *Ibid.* 37 : 658-666.
- Wu, J. H. and Dimitman, J. E. (1970). *Ibid.* 40 : 820-827.